

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15137

研究課題名(和文) マラリア原虫特異的ロブトリー分泌型タンパク質の肝臓感染における役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the rule of Plasmodium parasite specific rophtry protein in liver infection

研究代表者

馬場 みなみ (BABA, Minami)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・研究員

研究者番号：00814906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、肝細胞感染型であるスポロゾイトの、ロブトリーに存在するRALP1の肝細胞感染における役割を明らかにすることであった。スポロゾイト時期特異的にRALP1の発現を抑制した原虫(RALP1-cKD)を作成、そのスポロゾイトをマウスに静注し、肝臓内の原虫量を定量した。どのタイムポイントでもRALP1-cKD原虫とコントロールに差は見られなかった。一方肝臓を経て血液中に出現したメロゾイトは、RALP1-cKD原虫で減少していることから、RALP1は肝細胞から放出されたメロゾイトが、赤血球に感染するまでに機能しているとわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スポロゾイトが有しているロブトリーの分子の多くは、もう一つの感染型であるメロゾイトで必須であるために、ノックアウト原虫の作出ができず、逆遺伝学手法による機能解析が困難であった。本研究では、メロゾイトで必須であるRALP1を、プロモーター置換法を用いてスポロゾイト時期特異的に発現抑制することで、スポロゾイトの肝臓感染におけるRALP1の機能解析を可能にした。スポロゾイトに発現するロブトリー分子の機能を網羅的に解析することは、同様にロブトリーを有する他のアピコンプレクサ類に共通する、細胞寄生メカニズムの解明に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Rhoptry-associated leucine zipper-like protein 1 (RALP1) is one of rophtry proteins which are conserved among in infective stage, merozoite and sporozoite. The attempts to generate RALP1 knockout parasites have failed possibly due to its essentiality for the parasite proliferation during blood stage. Therefore, until now, the function of RALP1 in sporozoites remains unelucidated.

To elucidate RALP1 function during sporozoite invasion, we applied the sporozoite stage-specific knockdown system by promoter swapping in the rodent malaria parasite strain, Plasmodium berghei. The amount of ralp1 mRNA in RALP1-cKD sporozoites were 10-fold lower than those in RALP1-control sporozoites. Parasitemias of RALP1-cKD sporozoite inoculated mice at 3 days after sporozoite inoculation were about 10-fold lower than those of RALP1-control sporozoite inoculated mice. It suggests that RALP1 plays an important role during liver infection stage of sporozoites.

研究分野：寄生虫

キーワード：マラリア スポロゾイト 肝細胞 ロブトリー分子 RALP1 sporozoite liver stage rophtry

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫はハマダラ蚊によって人に媒介される。蚊の中腸壁で形成された肝臓感染型（スポロゾイト）は、体腔内を移動し、唾液腺へと集積する。これらのスポロゾイトは蚊の吸血の際、唾液腺より皮膚内に注入され、血流を経て最初に肝細胞に侵入・寄生する。次いで、肝細胞内で増殖・分化して赤血球感染型（メロゾイト）となり、これらが赤血球に侵入して感染を繰り返すことで発熱・貧血などの病態を引き起こす（図1）。従って、スポロゾイトの肝細胞への寄生は、哺乳類への感染成立段階ということができ、感染阻止の視点からスポロゾイトの肝細胞感染機構の解明が望まれている。

マラリア原虫の感染型であるスポロゾイト及びメロゾイトの先端部には、感染に重要と言われている分泌型タンパク質を貯蔵する2つの小器官（ロプトリーとマイクロネーム）が存在する。スポロゾイトにおいては、マイクロネームに貯蔵されるタンパク質が、スポロゾイトの運動や肝細胞侵入に関与することが明らかになりつつある。一方で、ロプトリーに貯蔵されるタンパク質については、メロゾイトのロプトリーと共通の分子が同定されているが、その機能は明らかでない。感染型原虫であるメロゾイトとスポロゾイトの感染に関与する分子は両者に共通なものも多く、その場合には遺伝子欠損原虫を赤血球ステージで作出することができないため、従来の逆遺伝的手法を用いたスポロゾイトの機能解析が不可能であったことがその大きな理由である。我々の研究室ではスポロゾイト時期特異的にタンパク質の発現を抑制する方法を開発することにより、メロゾイトに必須なタンパク質のスポロゾイト期における機能解析を可能にした。

スポロゾイト時期特異的に、標的タンパク質を発現抑制した原虫を用いて解析を続けるうちに、Rhoptry-associated, leucine zipper-like protein 1 (RALP1) を含む数種類のタンパク質は、発現を抑制してもスポロゾイトの形成や唾液腺侵入には影響しなかった。そこで次に、RALP1 はスポロゾイトの哺乳動物への感染に重要な役割を持っているのではないかと検討した。

## 2. 研究の目的

本研究は、スポロゾイトのロプトリーに貯蔵される分泌型タンパク質、RALP1 の肝細胞寄生における役割を明らかにすることを目的とし、RALP1 の局在と機能する時期を、独自に開発した逆遺伝学的手法により解析する。これにより、スポロゾイトの肝臓への感染メカニズムの解明に繋げようとするのである。

## 3. 研究の方法

(1) 作出したスポロゾイト時期特異的 RALP1 発現抑制原虫の性状確認

① 遺伝子導入位置の確認

既に作出済みであったスポロゾイト時期特異的 RALP1 発現抑制原虫 (RALP1-cKD 原虫) およびコントロール原虫に導入した遺伝子の位置が正確であるかを、サザンブロット法により確認した。

② RALP1-cKD 原虫スポロゾイトにおける RALP1mRNA 発現抑制の確認

RALP1-cKD 原虫およびコントロール原虫を感染させた蚊の中腸を取り出し、RNA を抽出し逆転写物を得た。RALP1 特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により、RALP1-cKD 原虫スポロゾイトの RALP1mRNA 量が減少しているかを確認した。

(2) 肝細胞感染における RALP1 の機能時期の特定

① in vivo における RALP1 機能時期の特定

RALP1 がスポロゾイトの肝臓感染に関与するかを明らかにするために、RALP1-cKD 原虫およびコントロール原虫の唾液腺スポロゾイトをマウスに静注し、肝臓ステージを経て血液中に出現した原虫を検出した。更に、肝臓への感染のどの段階に関与するかを明らかにするために、RALP1-cKD 原虫およびコントロール原虫の唾液腺スポロゾイトをマウスに静注し、感染初期である接種 24 時間後、発育期の接種 45-48 時間後、メロゾイト形成・放出が起こる接種 72 時間後に、全身灌流を行って肝臓を取り出した。RNA を抽出後、逆転写物を用いたリアルタイム PCR 法により、RALP1-cKD 原虫およびコントロール原虫の肝臓内原虫量を比較した。

② in vitro における、原虫発育への RALP1 の影響の評価

肝細胞に寄生した原虫は、周囲に寄生胞膜と呼ばれる構造を形成する。培養肝細胞 (HepG2) に RALP1-cKD 原虫およびコントロール原虫を感染させた。感染 48 時間後に細胞を固定し、原

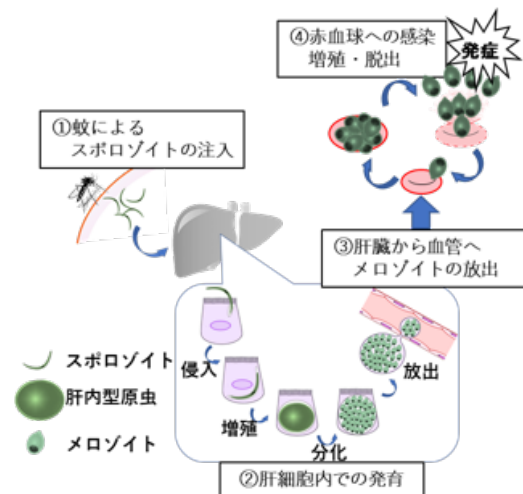


図1 哺乳類体内におけるマラリア原虫の生活環

虫と寄生胞膜を染色、肝内型原虫の大きさと数を測定した。RALP1-cKD 原虫とコントロール原虫を比較して発育する原虫の数や、個々の原虫の発育レベル（大きさ）に差があるかを検討し、RALP1 が肝臓内での原虫発育に関与するかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 作出したスポロゾイト時期特異的 RALP1 発現抑制原虫の性状確認

###### ① 遺伝子導入位置の確認

RALP1 は赤血球ステージの原虫で必須であるため、ノックアウトできない分子である。そこで、プロモーター置換法を利用して、スポロゾイト時期特異的に RALP1 の発現を抑制した原虫 (RALP1-cKD) を作出し、RALP1 の機能解析を行った。RALP1-cKD 原虫は、相同組換えを利用して、RALP1 のプロモーターを、赤血球ステージでのみ発現する分子 (*msp9*) のプロモーターと置換し、スポロゾイト特異的に RALP1 の発現を抑制した原虫である (図 2A)。コントロールとして、同様の手法を用いて、スポロゾイト・赤血球ステージどちらにも発現する分子である *rap1* のプロモーターと置換した原虫も作成した (コントロール原虫)。

これらの原虫の遺伝子組換えが想定通り行われているかを確認するため、サザンブロットを実施した。DNA が想定的位置に挿入されているかを明らかにするために、精製した各原虫の gDNA を制限酵素 EcoRI で消化し (図 2A, △)、RALP1 のコーディング領域に相補的な配列の Probe1 で、DNA 断片を検出した。それぞれの原虫で、図 2A で示した予想サイズ (Wild type: 1734 bp, RALP1-cKD: 2490 bp, コントロール: 2305 bp) に相当するバンドが検出された (図 2B 左)。このことから、DNA は想定的位置に挿入されていることが明らかとなった。次に、想定位置以外に DNA が挿入されていないかを確認するために、制限酵素 BamHI で消化し (図 2A, ▲)、組換え原虫のみが持つ、薬剤耐性遺伝子 (*hDHFR*) に相補的な配列の Probe2 で、DNA 断片を検出した。それぞれの原虫で、図 2A で示した予想サイズ (RALP1-cKD: 3054 bp, コントロール: 2869 bp) に相当するバンドが検出された (図 2B 右)。Wild type ではバンドが検出されなかった。このことから、DNA は想定位置以外には挿入されていないことが明らかとなった。

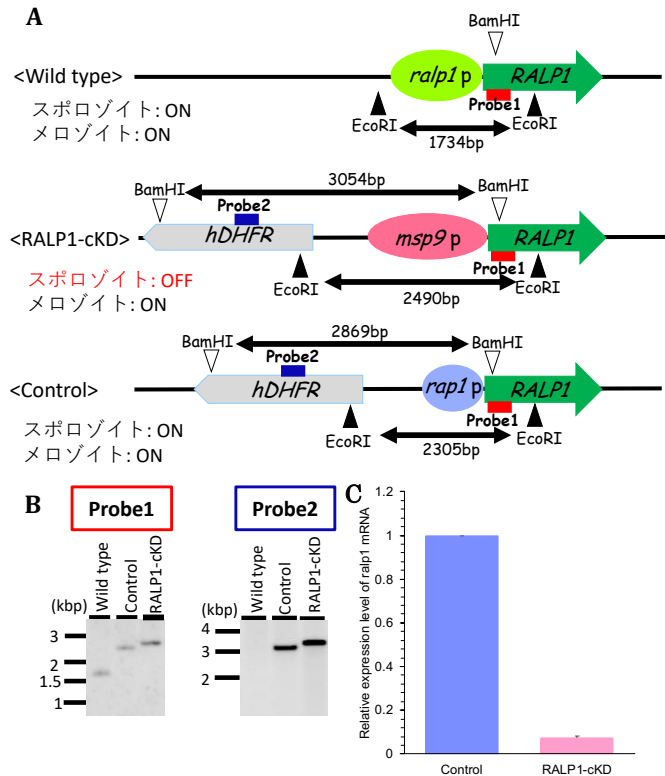


図 2 スポロゾイト特異的 RALP1 発現抑制原虫のクオリティチェック

###### ② RALP1-cKD 原虫スポロゾイトにおける RALP1 発現抑制の確認

RALP1-cKD 原虫スポロゾイトにおいて、RALP1 の発現が抑制されているかを確認するために、感染蚊の中腸より RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、RALP1 の配列に特異的なプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行なった。コントロール原虫と比較して RALP1-cKD 原虫スポロゾイトでは、RALP1 mRNA の発現量は十分の一程度まで減少していた (図 2C)。このことから、RALP1-cKD 原虫スポロゾイトでは、RALP1 の転写が抑制されていることが明らかとなった。

##### (2) 肝細胞感染における RALP1 の機能時期の特定

###### ① in vivo における RALP1 機能時期の特定

哺乳類体内に打ち込まれたスポロゾイトは血行性に肝臓へ到達し、肝類洞を通過、肝細胞へと寄生する。その後およそ 48 時間程度で何十万ものメロゾイトとなり、血流へと脱出し、赤血球に寄生する (図 3)。RALP1 がスポロゾイトの肝臓感染に関与するかを明らかにするために、感染蚊の唾液腺から取り出した RALP1-cKD 原虫およびコントロール原虫スポロゾイトを、マウスの尾静脈より接種した。3 日後、感染赤血球数をカウント

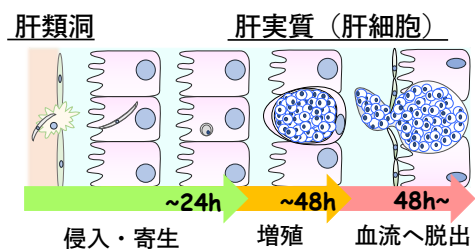


図 3 *Plasmodium berghei* における肝臓感染

すると、コントロール原虫接種群と比較して RALP1-cKD 原虫接種群では、感染赤血球の割合が、1/10 程度まで減少していた (図 4A)。このことは、RALP1-cKD 原虫の肝臓感染のいずれのステージかが阻害されていることを示唆する。以上から、RALP1 がスポロゾイトの肝臓感染に関与している可能性を見出した。

RALP1 が肝臓感染ステージのどこに関与しているかを明らかにするため、RALP1-cKD 原虫およびコントロール原虫スポロゾイトをマウス尾静脈に接種し、24、45-48、72 時間後に肝臓を回収し、肝臓に含まれる原虫量を比較した。

スポロゾイト接種 24 時間後では、コントロール原虫接種群と比較して、RALP1-cKD 原虫接種群の肝臓内原虫量は、減少していなかった (図 4B)。このことから、RALP1 は、スポロゾイトの肝類洞通過や、肝細胞への寄生に必須でないことが示唆された。

スポロゾイト接種 45 時間後のコントロール原虫接種群では、接種 24 時間後のサンプルと比較して、20 倍程度の原虫量の増加が見られた。RALP1-cKD 原虫接種群でも、同程度の原虫量増加が見られた (図 4C)。このことから、RALP1 は、肝内型原虫の発育に必須ではないことが示唆された。

スポロゾイト接種 72 時間後のコントロール群では、接種 48 時間後と比較して肝臓内原虫量は、100 分の 1 程度まで減少していた (図 4D)。これは赤血球感染型原虫 (リバーシャイゾント) の肝外への脱出に伴い、肝臓内原虫量が減少したと考えられる。RALP1-cKD 原虫接種群でも、同程度の原虫量減少が見られた。RALP1-cKD 原虫接種群では、感染赤血球の割合が 1/10 程度まで減少していたことと併せると、RALP1 は、成熟したリバーシャイゾントの放出にも必須でないと推測された。

## ② in vitro における、原虫発育への RALP1 の影響の評価

in vivo での結果では、感染 45-48 時間後において、コントロール原虫接種群と RALP1-cKD 原虫接種群で同程度の肝臓内原虫量の増加が見られた。しかし、in vivo の実験系では肝細胞に寄生した原虫が正常に発達しているのか、寄生している原虫数がコントロール接種群よりも多く、1 つ 1 つは発達していないのか、区別することができない。そこで、培養肝細胞 HepG2 にコントロール原虫と RALP1-cKD 原虫スポロゾイトを接種し、48 時間後に肝内型原虫数と肝内型原虫の直径を比較した。肝内型原虫数 (図 5A)、肝内型原虫直径 (図 5B) とともに、コントロール原虫接種群と RALP1-cKD 原虫接種群で差は見られなかった。このことから、RALP1 は原虫の肝細胞内での発育に必須でないことが明らかとなった。

一連の結果から RALP1 の機能時期は、肝細胞から放出されたリバーシャイゾントが赤血球に感染するまでと絞り込むことができた。成熟したリバーシャイゾントの感染性を、RALP1-cKD 原虫接種群とコントロール原虫接種群で比較することで、RALP1 の機能時期の更なる特定が期待できる。

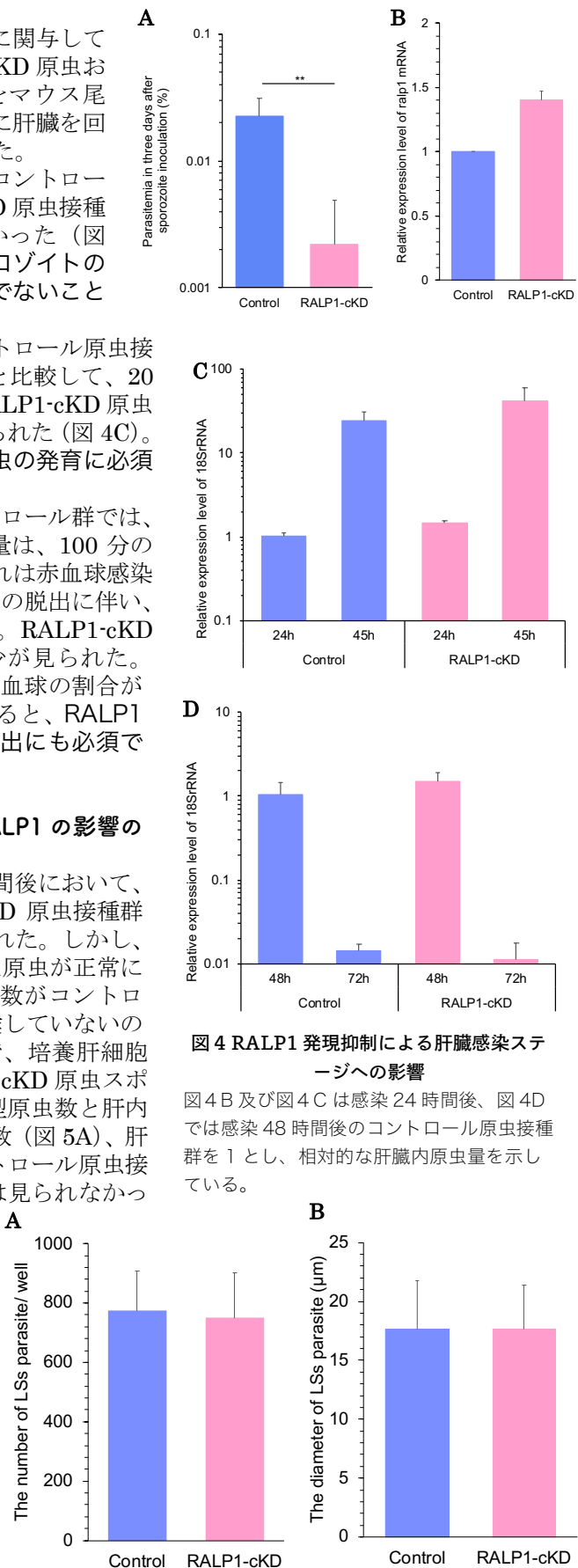


図 4 RALP1 発現抑制による肝臓感染ステージへの影響

図 4B 及び図 4C は感染 24 時間後、図 4D では感染 48 時間後のコントロール原虫接種群を 1 とし、相対的な肝臓内原虫量を示している。

図 5 RALP1 発現抑制による肝内型原虫感染数と発達への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 馬場 みなみ、野崎 守、鳥居 本美、石野 智子
2. 発表標題 マラリア原虫スポロゾイト肝臓感染における RON4 の機能解析
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場 みなみ、野崎 守、鳥居 本美、石野 智子
2. 発表標題 マラリア原虫スポロゾイトの肝臓感染におけるRON4の役割の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場 みなみ、野崎 守、鳥居 本美、石野 智子
2. 発表標題 マラリア原虫スポロゾイト運動能におけるRON4の役割
3. 学会等名 第27回分子寄生虫学ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minami Baba, Mamoru Nozaki, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 The role of RON4 in Plasmodium sporozoite infection of the liver
3. 学会等名 67th Annual meeting of American Society of Tropical Medicine & Hygiene (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minami Baba, Mamoru Nozaki, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 RON4 is involved in sporozoite motility and liver invasion
3. 学会等名 Molecular Approaches to Malaria 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minami Baba, Mina Fujii, Yuka Sugino, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 RALP1 is involved in Plasmodium sporozoite transmission to mammalian hosts
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minami Baba, Mina Fujii, Yuka Sugino, Motomi Torii, Tomoko Ishino
2. 発表標題 RALP1 is localized to rhoptries in sporozoites and involved in infection of the mammalian liver
3. 学会等名 American Society of Tropical Medicine and Hygiene 67th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考